

CHROM. 7372

REINIGUNG VON PHOSPHORSÄUREINSEKTIZIDRÜCKSTÄNDEN IN GEMÜSEEXTRAKTEN DURCH GELCHROMATOGRAPHIE AN SEPHADEX LH-20

J. PFLUGMACHER und W. EBING

Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D 1 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 21. Januar 1974)

SUMMARY

Clean-up of organophosphorus insecticide residues in vegetable extracts by gel chromatography on Sephadex LH-20

A gel permeation method, using Sephadex LH-20 and including a liquid-liquid partition step, has been utilized for the separation of twenty-two organophosphorus pesticides from twelve vegetable extracts. Recoveries of the different pesticides ranged between 66–98%. Residue levels were equivalent to 0.05–0.5 ppm, based on the original vegetable. Pesticide analysis was done by gas chromatography, using a thermionic detector. The method, as described, may be used as a general clean-up technique for organophosphorus insecticides residues in vegetables.

EINLEITUNG

Die Gelchromatographie (Gelfiltration) ist eine analytische Methode zur Trennung von Substanzgemischen nach ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Molekülgröße. Die Molekulargewichte der Mehrzahl der insektiziden Phosphorsäureester (P-Ester) liegen im Bereich von 200–400, während die meisten der pflanzeigenen Inhaltsstoffe Molekulargewichte von 500–900 aufweisen. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe der Gelchromatographie eine Abtrennung der pflanzeigenen Stoffe von den insektiziden Wirkstoffen möglich sein. In der Tat haben bereits einige Autoren untersucht, ob die Gelchromatographie in dieser Hinsicht brauchbar ist.

Ruzicka *et al.*¹ versuchten mit Hilfe des gelchromatographischen Systems Sephadex LH-20/Äthanol, insektizide P-Ester von Weisskohlextrakten abzutrennen. Sie berichteten, dass die Aufreinigung unter den gegebenen Versuchsbedingungen unbefriedigend verlief, weil zu viele Extraktstoffe im Elutionsbereich der P-Ester vorhanden waren. Horler² sowie Hertel und Sacher³ benutzten mit Erfolg die Gelchromatographie an Sephadex LH-20/Äthanol zur Reinigung von Getreideextrakten für die Rückstandsanalytik insektizider Chlorkohlenwasserstoffe und P-Ester. Gorbach *et al.*⁴ untersuchten die Eignung der Polystyrolgele für die Reinigung der Extrakte mit verschiedenen Wirkstoffen, besonders aber Triazophos und Pyrazophos in Hopfen. Nach chromatographischer Reinigung am System Bio-Beads SX-8/Benzol, wiesen Åker *et al.*⁵ 0,4 ppm Malathion in Weizenextrakten mit einer Wiederfindens-

rate von 90–112% nach. Stalling *et al.*⁶ gelang die Aufreinigung von Fischextrakten zum Nachweis von Polychlorbiphenylen und insektiziden Chlorkohlenwasserstoffen mit Hilfe der Gelchromatographie am System Bio-Beads SX-2/Cyclohexan. Die vorliegende Arbeit beschreibt die gelchromatographische Reinigung von zwölf Gemüseextrakten am System Sephadex LH-20 zum störungsfreien gaschromatographischen Nachweis von Rückständen insektizider Phosphorsäureester.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien und Geräte

Zur Extrakterstellung wurden Aceton, Methylenchlorid (p. A., Fa. E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) und Äthanol absolut, unvergällt (Monopolverwaltung), verwendet. Die verwendeten Phosphorsäureester besaßen in der Regel einen Reinheitsgrad von 96–98%.

Die folgenden Geräte wurden verwendet: Hewlett-Packard (Avondale, Pa., U.S.A.) Modell 7620 A und Varian (Palo Alto, Calif., U.S.A.) Modell 2800 Gaschromatographen. Eine gelchromatographische Ausrüstung, die aus einer Chromatronix (Berkeley, Calif., U.S.A.) Modell CMP3 Pumpe bestand; ferner ein Chromatronix Modell SV-8031 Probenaufgabeventil und eine Pharmacia (Uppsala Schweden) Typ SR 25/100 Säule, 1 m × 25 mm Durchmesser, ausgestattet mit zwei verstellbaren Adaptern. Ein Buchler (Fort Lee, N.J., U.S.A.) Fracto-Scan UV Monitor (Wellenlänge 254 nm) und ein Metrawatt Servogor Kompensationsschreiber.

Packung der Säule

118 g Sephadex LH-20 werden in Äthanol 24 h gequollen. Die Packung der Säule erfolgt in üblicher Weise mit Hilfe eines Füllreservoirs. Anschliessend wird so lange Lösungsmittel mit einer Durchflussrate von 45 ml/h durch die Säule gepumpt, bis eine konstante Füllhöhe erhalten wird. Sodann erfolgt die Fixierung des Gelbettes in seiner Lage durch die Adapter. Das Gesamtvolumen V_0 des so hergestellten Gelbettes beträgt 376 ml.

Extraktherstellung

Die in Aceton gelösten Wirkstoffe (5–50 μg je Wirkstoff) werden auf 100 g des zerkleinerten Probenmaterials gegeben. Nach einer Wartezeit von 60 min werden 200 ml Aceton hinzugefügt und die Probe 3 min am Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wird mit 5 g Celite 545 vermischt und auf einer Porzellannutsche abgesaugt. Ultra Turrax und Filtrerrückstand werden zweimal mit je 25 ml Aceton nachgespült. Ein Fünftel des Filtratvolumens wird in einen Scheidetrichter von 1000 ml Inhalt gebracht. Dieser aliquote Teil des Acetonextraktes wird mit 250 ml dest. Wasser und 35 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt. Nach Zugabe von 60 ml Methylenchlorid wird 2 min lang kräftig durchgeschüttelt. Die Methylenchloridphase wird abgetrennt, die wässrige Phase nochmals mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt und dann verworfen. Die vereinigten Methylenchloridphasen werden mit dem Gemisch aus 250 ml dest. Wasser und 35 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Methylenchloridphase wird abgelassen und mit 10 g Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Na_2SO_4 wird der Filtrerrückstand mit dreimal 10 ml Methylenchlorid nachgespült. Anschliessend wird die Lösung am Rotations-

verdampfer auf 1–2 ml eingengt, mit 5 ml Äthanol versetzt und erneut eingengt. Nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur wird der Extrakt in einen 1 ml fassenden Messkolben überführt und unter einem Stickstoffstrom auf die 1 ml-Marke eingestellt.

Ermittlung der Elutionsvolumina

Zur Ermittlung der Elutionsvolumina wird jeweils 1 ml einer Reinslösung des betreffenden P-Esters in einer Konzentration zwischen 1–10 µg/ml mit Hilfe des Probenaufgabeventils auf die Säule gegeben. Das aus der Säule ausfließende Eluat wird durch die Küvette des UV-Monitors geleitet und die Absorption bei 254 nm durch den Kompensationsschreiber registriert. Die graphische Auswertung der erhaltenen Chromatogramme ergab die entsprechenden Elutionsvolumina. Von denjenigen P-Estern, die bei 254 nm wenig oder gar nicht absorbieren, werden die Elutionsvolumina ermittelt, indem das Säuleneluat in 4 ml-Fractionen aufgefangen und anschliessend gaschromatographisch untersucht wird.

Gelchromatographische Reinigung des Rohextraktes

1 ml Rohextrakt wird über das Probenaufgabeventil auf die Säule gebracht und bei einer Durchflussrate von 45 ml/h chromatographiert. Die Fraktion des Säuleneluats im vorher ermittelten Elutionsbereich der auf diesem Substrat untersuchten P-Ester wird aufgefangen und auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Anschliessend werden die so gereinigten Extrakte gaschromatographiert. In gleicher Weise werden Leerextrakte auf ihre Reinheit untersucht, um mögliche Interferenzen von Peaks aus eventuell noch vorhandenen Pflanzeninhaltsstoffen festzustellen.

Gaschromatographische Bestimmung

Die Rückstände in den gereinigten Extrakten werden unter folgenden Bedingungen bestimmt: Trennsäule, 2.06 m × 1.9 mm i.D., 4% OV-17 auf Chromosorb W-HP-AW-DMCS (0.120–0.150 mm); Einspritzblocktemperatur, 240 °; Temperaturprogramm, 200 °–230 ° (4 °/min); thermionischer Detektor.

Die Durchführung wurde früher durch einen von uns⁷ beschrieben.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die ermittelten Elutionsvolumina der untersuchten P-Ester finden sich in Tabelle I. Der relative Fehler der Elutionsvolumina lag bei 1–2%. Während des Untersuchungszeitraums, der sich über 18 Monate erstreckte, änderten sich die Elutionsvolumina nicht. Weiterhin ergab sich, dass die Elutionsvolumina und Peakbreiten der einzelnen Wirkstoffe weder durch Mischung mit anderen Wirkstoffen noch durch die pflanzlichen Extraktstoffe beeinflusst werden.

Die Gaschromatogramme der gereinigten Extrakte wiesen keine Interferenzpeaks auf. Dieses Kriterium schien uns für die Eignung in der Praxis ausreichend. Es wurde daher auf die Auswägung restlicher Extraktstoffe in den wirkstoffhaltigen Eluatfraktionen verzichtet. Zwar gibt diese von einigen Autoren^{1,2,4} durchgeführte Auswägemethode Aufschluss auf eine generelle Reinigungskapazität. Dabei ist jedoch noch nicht entschieden, inwieweit ein Clean up-Problem durch unwägbare Mengen von Inhaltsstoffen, die Detektor-aktiv sind, noch weiterhin erschwert bleibt.

TABELLE I

ELUTIONSVOLUMINA INSEKTIZIDER PHOSPHORSÄUREESTER AN SEPHADEX LH-20

<i>Wirkstoff</i>	<i>Elutionsvolumen (ml)</i>
Azinphos-äthyl	412
Bromophos-äthyl	305
Bromophos	316
Chlorfenvinphos	290
Chlorthion	392
Diazinon	290
Dibrom	305
Dichlofenthion	325
Dichlorvos	306
Dimethoat	325
Disulfoton	330
Ethion	309
Fenchlorphos	380
Fenitrothion	396
Fensulfothion	360
Fenthion	399
Malathion	315
Mevinphos	298
Paraoxon	315
Parathion	376
Parathion-methyl	428
Phenkapton	378
Phorat	345
Thionazin	318

Das System Sephadex LH-20/Äthanol wurde von uns gewählt, weil ein grosser Teil der insektiziden P-Ester ein aromatisches Ringsystem aufweist. Bekanntlich entwickelt Sephadex LH-20 gegenüber Aromaten, wie u.a. Joustra *et al.*⁸ festgestellt haben, einen besonderen Rückhalteeffekt, wenn als Quell- bzw. Elutionsmittel niedere Alkohole verwendet werden. Im vorliegenden Fall wirkt sich die durch diese reversible Adsorption hervorgerufene Erhöhung der Elutionsvolumina dieser P-Ester günstig auf deren Abtrennung von den Extraktstoffen des Pflanzenmaterials aus.

Tabelle II enthält die unter den beschriebenen Bedingungen erzielten Ergebnisse. Die Wiederfindensraten stellen Mittelwerte dar, die aus fünf bis zehn Einzelbestimmungen jedes einzelnen Wirkstoffs auf jedem der in Frage kommenden Substrate errechnet worden sind. In Klammern ist der von den Einzelwerten überdeckte jeweilige Streubereich angegeben. Die Rückstandskonzentrationen der einzelnen P-Ester, die im Bereich von 0.05–0.5 ppm liegen, wurden im Hinblick auf die in der deutschen Höchstmengenverordnung festgelegten Toleranzen gewählt.

Die Vorteile der beschriebenen Methode gegenüber den herkömmlichen Reinigungsverfahren — wie der Adsorptionschromatographie an Florisil, Silicagel oder Aluminiumoxid — liegen darin, dass stets die gleiche Säule nicht nur für eine,

TABELLE II
WIEDERFINDENS RATEN DER RÜCKSTÄNDE NACH GELCHROMATOGRAPHI-
SCHER REINIGUNG

Extrakt	Rückstand					
	<i>Azinphos-äthyl</i>		<i>Bromophos</i>	<i>Bromophos-äthyl</i>		
	ppm %		ppm %		ppm %	
Apfelmus					0.1	87.2 (85.1-90.3)
Blumenkohl					0.4	98.6 (96.1-101.3)
Chinakohl			0.1	83.4 (80.1-86.3)	0.5	82.3 (79.5-86.3)
Grüne Bohnen	0.4	98.6 (96.2-102.3)	0.1	87.2 (84.9-89.9)	0.4	95.5 (92.0-97.2)
Grünkohl						
Kohlrabi	0.4	96.7 (93.6-98.9)			0.4	91.5 (87.3-94.7)
Mohrrüben					0.1	81.2 (78.2-83.4)
Rosenkohl					0.4	95.8 (93.0-97.2)
Rotkohl					0.4	94.7 (91.2-98.9)
Salat			0.1	84.1 (81.3-88.2)	0.3	86.5 (84.3-91.5)
Spinat					0.1	83.4 (80.2-86.7)
Weisskohl			0.4	98.2 (94.0-99.8)	0.1	79.3 (78.1-83.7)
	<i>Chlorfenvinphos</i>		<i>Chlorthion</i>		<i>Diazinon</i>	
	ppm %		ppm %		ppm %	
Blumenkohl			0.2	99.8 (93.4-103.5)	0.2	92.1 (87.3-95.8)
Grüne Bohnen					0.1	98.3 (94.2-99.6)
Grünkohl			0.2	92.6 (89.1-96.2)		
Rotkohl	0.2	86.3 (84.7-89.3)	0.1	95.4 (89.7-98.4)	0.2	82.3 (78.6-85.9)
Spinat	0.4	77.8 (71.4-83.2)	0.2	99.2 (96.7-104.7)	0.1	83.3 (77.5-86.7)
Weisskohl					0.2	79.5 (74.3-83.8)
	<i>Dibrom</i>		<i>Dichlofenthion</i>		<i>Dichlorvos</i>	
	ppm %		ppm %		ppm %	
Blumenkohl	0.2	82.4 (78.6-87.3)	0.1	89.1 (86.3-94.6)	0.2	85.3 (81.0-88.3)
Grünkohl					0.1	62.2 (54.6-67.7)
Kohlrabi	0.1	77.0 (72.8-81.2)				
Mohrrüben	0.3	95.0 (89.7-98.5)			0.2	75.2 (70.9-78.3)
Rotkohl			0.1	83.0 (81.3-87.1)		
Spinat	0.2	82.9 (79.8-86.4)				
Weisskohl			0.1	85.1 (81.0-89.8)		
	<i>Dimethoat</i>		<i>Disulfoton</i>		<i>Ethion</i>	
	ppm %		ppm %		ppm %	
Blumenkohl	0.3	78.2 (74.1-80.6)	0.05	78.5 (75.3-80.3)	0.1	93.0 (89.7-96.8)
Chinakohl			0.1	81.4 (78.0-84.8)	0.1	97.6 (95.8-99.6)
Grüne Bohnen			0.05	83.5 (81.9-86.3)	0.1	95.7 (90.0-99.3)
Grünkohl	0.4	94.8 (90.0-99.1)				
Kohlrabi			0.1	76.3 (72.9-79.8)	0.1	89.3 (87.8-94.6)
Mohrrüben	0.3	89.0 (85.1-92.3)	0.1	85.9 (82.3-88.0)	0.1	96.2 (94.1-98.3)
Rosenkohl			0.1	98.6 (96.0-99.4)	0.1	86.0 (83.1-91.5)
Rotkohl			0.05	90.4 (86.7-94.3)	0.1	74.5 (70.7-79.9)
Salat			0.05	85.4 (81.7-89.3)	0.1	61.8 (54.7-68.1)
Spinat	0.3	80.8 (76.1-83.1)	0.1	79.1 (75.8-83.2)	0.1	97.0 (93.1-101.7)
Weisskohl	0.4	97.3 (93.7-101.7)	0.1	91.0 (87.2-94.3)		

(Fortsetzung S. 462)

TABELLE II (Fortsetzung)

Extrakt	Rückstand								
	Fenchlorphos			Fenitrothion			Fensulfothion		
	ppm	%		ppm	%		ppm	%	
Grüne Bohnen				0.2	98.7	(95.3-103.4)			
Kohlrabi	0.2	84.9	(80.1-86.4)	0.2	98.7	(94.3-101.2)			
Rosenkohl	0.3	97.1	(93.7-99.6)						
Rotkohl	0.2	81.3	(79.0-84.2)						
Spinat				0.2	49.0	(44.7-53.6)	0.4	86.0	(81.7-88.9)
Weisskohl	0.2	86.5	(81.7-87.9)				0.4	74.4	(69.3-77.9)
	Fenthion			Malathion			Mevinphos		
	ppm	%		ppm	%		ppm	%	
Apfelmus				0.4	91.4	(86.7-93.5)			
Kohlrabi	0.1	88.7	(84.3-90.6)						
Spinat	0.2	78.5	(73.6-82.7)	0.3	88.0	(83.7-91.4)			
Weisskohl	0.1	94.5	(89.7-97.3)	0.4	98.7	(96.0-100.6)	0.1	79.6	(74.2-83.1)
	Paraoxon			Parathion			Parathion-methyl		
	ppm	%		ppm	%		ppm	%	
Apfelmus				0.1	80.4	(77.3-84.5)			
Blumenkohl	0.1	71.9	(67.3-74.5)				0.05	91.7	(86.3-94.8)
Chinakohl							0.05	92.9	(89.7-96.3)
Grüne Bohnen							0.01	94.6	(89.6-98.5)
Grünkohl	0.1	96.0	(91.7-98.3)						
Kohlrabi				0.1	80.3	(75.9-84.3)	0.05	85.3	(83.1-88.5)
Mohrrüben				0.1	91.6	(87.3-94.6)	0.1	92.7	(89.8-95.3)
Rosenkohl							0.1	90.0	(86.3-97.5)
Rotkohl									
Salat							0.1	95.3	(91.9-97.5)
Spinat							0.1	89.3	(85.6-91.5)
Weisskohl				0.1	97.5	(93.7-99.6)	0.1	86.7	(83.2-91.5)
	Phenkapton			Phorat			Thionazin		
	ppm	%		ppm	%		ppm	%	
Apfelmus	0.1	93.5	(87.9-95.3)				0.1	96.4	(92.0-97.4)
Blumenkohl									
Grünkohl							0.2	98.0	(93.2-103.4)
Kohlrabi	0.1	95.3	(91.5-101.1)	0.2	97.5	(93.6-98.7)			
Rotkohl							0.1	85.6	(81.3-87.5)
Weisskohl	0.2	97.8	(94.3-99.1)						

* Der von den Einzelwerten überdeckte Streubereich ist in Klammern angegeben.

sondern für unendlich viele Analysen benutzt werden kann. Sie ist besonders dort angebracht, wo die Aufarbeitung des Untersuchungsgutes unter grösstmöglicher Schonung erfolgen muss; d.h. wenn die Rückstände gegenüber aktiven Oberflächen

(z. B. Al_2O_3) oder höheren Temperaturen (z.B. kombinierte Spül- und Codestillation, vgl. Pflugmacher und Ebing⁹) besonders empfindlich sind.

Weiterhin eröffnen die zum Teil deutlichen Unterschiede in den gut reproduzierbaren Elutionsvolumina der P-Ester eine zusätzliche Identifizierungsmöglichkeit für die Einzelkomponenten innerhalb der Wirkstoffklassen, worüber in Kürze berichtet werden wird.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung sowie Fräulein R. Ubrig und Fräulein I. Grabowski für ihre sorgfältige technische Mitarbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine für die Routinepraxis besonders geeignete Methode beschrieben, die mit Hilfe der Gelpermeation und eines Flüssig-Flüssig-Verteilungsschrittes zweiundzwanzig Phosphorpestizide aus zwölf verschiedenen Gemüserohextrakten abzutrennen gestattet. Die Bestimmung der Wirkstoffrückstände in den gereinigten Extrakten erfolgte durch Gaschromatographie mit thermionischem Detektor. Bei Rückständen im Bereich von 0.05–0.5 ppm lagen die Wiederfindensraten zwischen 66 und 98%. Der Anwendungsbereich dieser Aufbereitungsmethode kann auf nahezu alle Phosphorpestizidrückstände in pflanzlichen Lebensmitteln ausgeweitet werden.

LITERATUR

- 1 J. H. Ruzicka, B. B. Wheas, J. Thomson und N. F. Wood, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 14.
- 2 D. F. Horler, *J. Sci. Food Agr.*, 19 (1968) 229.
- 3 W. Hertel und V. Sacher, *Getreide Mehl*, 19 (1968) Heft 3, 17.
- 4 S. G. Gorbach, S. Winkler und E. Gaudernack, *Z. Anal. Chem.*, 267 (1973) 173.
- 5 N. L. Åker, H. S. Schanderl und N. C. Leeling, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 51 (1968) 888.
- 6 D. L. Stalling, R. C. Tindle und J. L. Johnson, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 32.
- 7 W. Ebing, *Pflanzenschutzberichte*, 38 (1968) 1.
- 8 M. Joustra, B. Söderqvist und L. Fischer, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 21.
- 9 J. Pflugmacher und W. Ebing, *Z. Anal. Chem.*, 263 (1973) 120.